

P21772.P03

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant :J. POINT et al.

Appl No. : Not Yet Assigned

PCT Branch

I.A. Filed : May 15, 2000

PCT/FR00/01302

For :METHOD FOR OBTAINING FROM A CULTURE MEDIUM OF MICROALGAE,
A HEAT-STABLE EXTRACT WITHH ANTIOXIDANT AND WOUND HEALING
ACTIVITY

CLAIM OF PRIORITY


Commissioner of Patents and Trademarks

Washington, D.C. 20231

Sir:

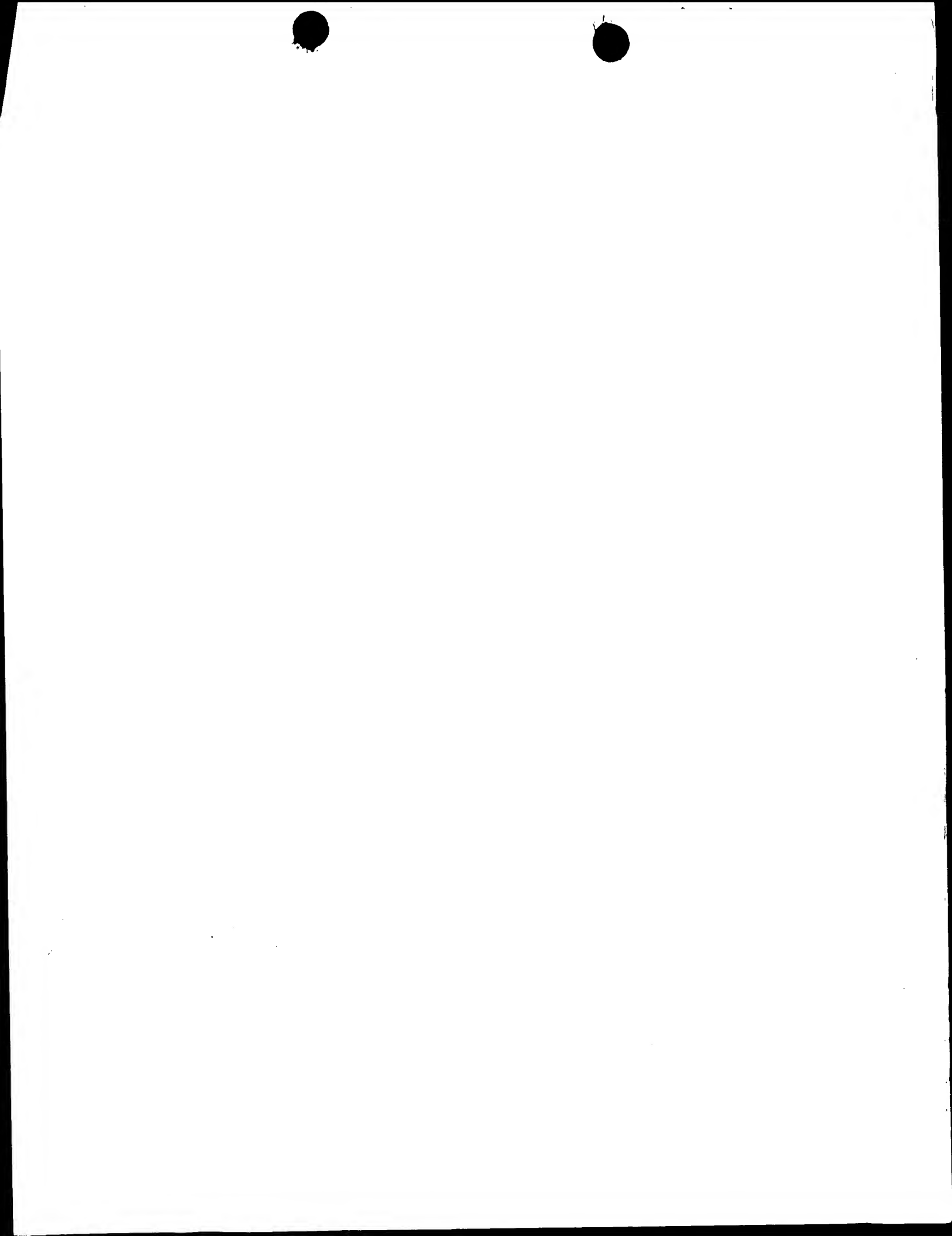
Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon French Application No. 99/07372, filed June 8, 1999. The International Bureau already should have sent a certified copy of the French application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
J. POINT et al.


Reg. No. 45,294

Neil F. Greenblum
Reg. No. 28,394

December 6, 2001
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191





REC'D 06 JUN 2000

WIPO

PCT

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

09/926718

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 22 MAI 2000

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE

26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **0 8 JUIN 1999**

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9907372**

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT **SI**

DATE DE DÉPÔT

0 8 JUIN 1999

1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE

**CABINET MAISONNIER
26, place Bellecour
69002 LYON**

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen

☒ demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant
A 558 - F I

04 72 77 71 77

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ immédiat

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**PROCEDE D'OBTENTION, A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE DE MICRO-ALGUES, D'UN EXTRAIT
THERMOSTABLE POSSEDANT UNE ACTIVITE ANTI-OXYDANTE ET PRO-CICATRISANTE.**

3 DEMANDEUR (S) n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

AQUAMER

Forme juridique

SAEM

Nationalité (s) **Française**

Adresse (s) complète (s)

**Station de Lagunage de Mèze
BP 118
34140 MEZE**

Pays

FRANCE

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ non

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

FRANCE

98/14510

16/11/1998

BREVET D'INVENTION

FRANCE

99/06375

18/05/1999

BREVET D'INVENTION

7 DIVISIONS

antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire)

N. CPOULIQUEN

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

M.C. JACQUEMIN

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg

75800 Paris Cédex 08

Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

990 7372

TITRE DE L'INVENTION :

PROCEDE D'OBTENTION, A PARTIR DU MILIEU DE CULTURE DE MICRO-ALGUES, D'UN
EXTRAIT THERMOSTABLE POSSEDANT UNE ACTIVITE ANTI-OXYDANTE ET PRO-CICATRISANTE.

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

AQUAMER SAEM

Station de Lagunage de Mèze

BP 118

34140 MEZE

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

POINT Jacques

48, rue de NIERME

01100 OYONNAX

BACCOU Jean-Claude

82, rue AZALAIS d'ALTIER

34080 MONTPELLIER

BAROUX Bruno

15, allée du Biau

34580 SAUSSAN

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

8 JUIN 1999

CABINET MAISONNIER

26, Place Bellecour

69002 LYON

Tél. 04 72 77 71 77

Fax 04 78 37 13 62

La présente invention a pour objet un procédé d'obtention, à partir du milieu de culture de micro-algues, d'un extrait thermostable possédant une activité anti-oxydante et pro-cicatrisante liée à une teneur élevée en superoxydismutases-like et en polysaccharides sulfatés, et susceptible de trouver des applications dans l'industrie chimique, l'industrie cosmétique, l'industrie pharmaceutique et l'industrie agronomique, ainsi que dans les domaines de la nutraceutique et de la diététique.

De nombreux travaux ont déjà été effectués, dans le domaine cosmétique, pour mettre au point des substances antiradicalaires propres notamment à ralentir le vieillissement cutané. Parallèlement, des recherches ont été menées dans le secteur médical pour obtenir des produits à activité anti-inflammatoire, aptes à être utilisés notamment en rhumatologie et dans le traitement de pathologies liées à des stress oxydatifs et affectant les systèmes digestif et cardio-vasculaire.

Les recherches entreprises ont été délibérément orientées ces dernières années vers le secteur végétal afin d'éviter les substances infectieuses qui risquent de se trouver dans les extraits animaux.

Parmi ces recherches, la culture de micro-algues a conduit à l'obtention de produits intéressants à partir de la biomasse algale. Toutefois les techniques mises en oeuvre présentent l'inconvénient d'être complexes et de conduire au rejet du milieu de culture desdites micro-algues.

La présente invention est basée sur la découverte des propriétés inattendues du milieu de culture des micro-algues, qui peut dans certaines conditions produire des quantités importantes de superoxydismutases like (SOD like) et de polysaccharides sulfatés (PS).

Les superoxydismutases like (SOD like) sont des produits qui présentent le même type d'activité que les superxoydismutases (SOD), avec l'avantage sur ces dernières d'être thermostables, ce qui n'est pas le cas des enzymes en général, et des superoxydismutases en particulier.

La présente invention a ainsi pour objet un procédé d'obtention d'un extrait du milieu de culture de micro-algues, ce procédé se caractérisant essentiellement en ce qu'il consiste à réaliser dans un premier temps la culture desdites micro-algues puis à leur imposer dans un deuxième temps une sursaturation en oxygène qui produit un forçage métabolique conduisant à une surproduction de composés antioxydants.

Les micro-algues mises en oeuvre dans le procédé selon l'invention sont préférentiellement choisies dans le groupe des Rhodophyceae, et notamment le *Porphyridium cruentum* (PC).

Conformément à l'invention, la culture des micro-algues choisies s'effectue dans un photobioréacteur de type classique, dans lequel l'énergie solaire ou un éclairage approprié permet de réaliser la photosynthèse à la base de ladite culture, dans des conditions contrôlées de température, de pH et d'alimentation en dioxyde de carbone CO₂.

L'alimentation en CO₂ du milieu de culture, ainsi que l'agitation nécessaire au bon développement des micro-algues, peuvent être assurées par un bullage d'air enrichi en CO₂ comprimé ou par tout autre moyen équivalent.

Au bout d'un temps de culture suffisamment long, de l'ordre de 6 à 12 jours, lorsque la densité cellulaire du milieu de culture est optimale, on y ajoute 100 mg/l de bicarbonate de potassium, puis on ferme le réacteur et on laisse la culture se poursuivre pendant un temps de l'ordre de 1 à 3 jours afin de créer un forçage métabolique provoqué par la sursaturation du milieu en oxygène provenant de la photosynthèse, le bicarbonate de potassium apportant le carbone nécessaire à cette photosynthèse.

Les algues sont ensuite séparées du milieu de culture par centrifugation ou filtration. Une filtration à l'aide d'un filtre approprié permet ensuite de séparer l'extrait anti-oxydant.

Le filtre utilisé pour séparer l'extrait

recherché peut être une membrane cellulosique à dimensions de pores de 1 à 1,5 μ m.

5 Le produit ainsi extrait du milieu de culture des micro-algues renferme au moins 30 unités par millilitre de SOD like, mesure effectuée à l'aide du kit commercialisé sous la dénomination "SOD-525". Il renferme en outre au moins 1 mg/ml de polysaccharides sulfatés.

10 La teneur élevée en SOD like de l'extrait selon l'invention lui confère des propriétés anti-inflammatoires qui peuvent trouver une application en rhumatologie, ainsi que des propriétés antiradicalaires qui peuvent être utilisées en cosmétique, dans la préparation de crèmes contre le vieillissement cutané.

15 D'autre part la teneur importante en polysaccharides sulfatés de l'extrait selon l'invention lui confère des propriétés de régénération tissulaire qui, associées aux propriétés antiradicalaires des SOD like, en font un excellent produit pro-cicatrisant.

20 Le produit selon l'invention peut également être utilisé pour renforcer les activités anti-oxydantes d'autres extraits végétaux, notamment dans la lutte biologique contre les parasites végétaux. Ainsi des produits à activité peroxydasique peuvent bénéficier d'une activité nettement accrue par addition d'environ 10 % de l'extrait selon l'invention.

25 Le produit selon l'invention présente l'avantage d'être thermostable, notamment à 121°C pendant vingt minutes.

30 Selon l'application envisagée pour l'extrait selon l'invention, on peut l'utiliser tel qu'obtenu selon le procédé décrit ci-dessus. Toutefois on peut aussi séparer les composés actifs de manière à obtenir deux produits à activités différentes, l'un contenant les SOD like et l'autre les polysaccharides sulfatés.

35 La séparation de la partie renfermant les SOD like peut s'effectuer par précipitation à l'aide d'un solvant tel que l'éthanol ou par séparation à l'aide d'une membrane organique telle qu'une membrane de cellulose, de dimensions de pores comprises entre 1 000 et 50 000

daltons. On obtient ainsi deux extraits dont l'un, renfermant les SOD like, présente une activité anti-oxydante et antiradicalaire, tandis que l'autre, renfermant les polysaccharides sulfatés, présente une activité de régénération tissulaire.

La présente invention sera mieux comprise à la lumière des exemples qui suivent, fournis à titre de simple illustration de l'invention, vis-à-vis de laquelle ils ne présentent aucun caractère limitatif.

EXEMPLE 1

Obtention d'un extrait du milieu de culture de *Porphyridium cruentum* (PC)

Dans un photobioréacteur de 150 litres l'algue est cultivée dans un milieu type Conway - eau de mer artificielle. L'inoculation est faite par 5l de culture à 5 millions de cellules par millilitre. Un bullage d'air assure l'agitation et la fourniture de CO₂. L'éclairage est assuré par l'énergie solaire ou par des lampes distribuant 100 μ moles/m²/s.

Au bout de 12 jours, lorsque la densité cellulaire est optimale, on rajoute 100 mg par litre, soit 15 g de KHCO₃, puis on ferme le réacteur et on laisse la culture se poursuivre pendant 2 jours afin de créer un forçage métabolique.

Après ce temps, les algues sont séparées par centrifugation du milieu de culture, puis ce dernier est filtré sur membrane cellulosique à pores de 1,2 μ m.

L'extrait ainsi obtenu présente une teneur en SOD like de 30 U/ml, mesurée au kit SOD-525, et une teneur en polysaccharides sulfatés de 1mg/ml.

Cet extrait peut être stérilisé à 121°C pendant 20 minutes, puis conditionné en flacons stériles, sans que cette opération modifie l'activité SOD, ni la teneur en PS.

Il peut aussi être déshydraté par lyophilisation pour être ensuite utilisé dans la préparation de compositions telles que des comprimés.

EXEMPLE 2

Séparation des activités

A partir de 10 litres de l'extrait obtenu à l'exemple 1, on sépare par traitement à l'éthanol la partie SOD like des polysaccharides sulfatés, qui précipitent.

On obtient ainsi deux extraits, dont l'un présente une activité antiradicalaire non altérée par la séparation, et l'autre renferme les polysaccharides sulfatés et présente une activité de régénération tissulaire.

Chacun des deux extraits peut être conservé sous forme aqueuse, après stérilisation et conditionnement en flacons stériles.

Les extraits peuvent aussi être conservés sous forme de poudre soluble, après lyophilisation.

EXEMPLE 3

Produits cosmétiques

1) Crème anti-vieillissement cutané.

Dans un malaxeur approprié on réalise le mélange suivant, exprimé en pourcentage en poids :

EXTRAIT selon l'exemple 1	10
PEG-8 BEESWAX	8
OCTYDODECYL MYRISTATE	10
ISOSTEARYL ISOSTEARATE	10
SODIUM HYDROXIDE	0,4
ETHOXYDIGLYCOL	5
EAU, PARFUM, CONSERVATEUR	QSP 100

Une objectivation in vitro de la crème ainsi obtenue permet de constater une prolifération de fibroblastes, même en présence d'agents anti-prolifératifs introduits dans le milieu, ce qui constitue l'indice d'un effet trophique et pro-reconstituant.

2) Brumisateur adoucissant pour peau fragilisée

On conditionne le liquide de l'exemple 1 dans un flacon propulseur à l'azote.

EXEMPLE 4

Composition diététique anti-stress oxydatif

A l'aide de l'extrait obtenu à l'exemple 1 on réalise des gélules de 250 mg de poudre, destinées à la nutraceutique et à la parapharmacie.

Des essais effectués sur rats, à raison d'une administration journalière de 5 mg de poudre, ont permis d'observer une augmentation des substances antiradicalaires dans le plasma sanguin.

EXEMPLE 5

Collyre anti-inflammatoire

On prépare un collyre selon la formulation suivante :

Gluconate de chlorhexidine	0,005 g
Inosine phosphate disodique déshydraté	0,5 g
Extrait liquide selon l'exemple 1	qsp 100 ml

Le collyre ainsi obtenu peut être utilisé dans le traitement des conjonctivites.

EXEMPLE 6

Produit alimentaire

A un concentré à 50 degrés Brix de tomates on ajoute 0,1 % en poids de la poudre de l'exemple 1, afin d'accroître sa durée de conservation.

EXEMPLE 7

Composition contre les parasites végétaux

L'extrait renfermant les PS de l'exemple 2 appliqué à des végétaux comme le melon ou la vigne induit une activité peroxydasique qui est le signe d'une résistance potentielle à des parasites comme les champignons.

EXEMPLE 8

Application aux polymères

L'extrait obtenu à l'exemple 1 peut, après déshydratation, être incorporé à des polymères pour augmenter leur résistance à l'oxydation.

REVENDEICATIONS

1) Procédé d'obtention, à partir du milieu de culture de micro-algues, d'un extrait thermostable possédant une activité anti-oxydante et pro-cicatrisante, caractérisé en ce qu'il consiste à réaliser dans un premier temps la culture desdites micro-algues, à leur imposer dans un deuxième temps une sursaturation en oxygène, puis à séparer les algues du milieu de culture par centrifugation, et enfin à filtrer ledit milieu de culture sur un filtre approprié pour séparer ledit extrait.

2) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la culture des micro-algues s'effectue dans un photobioréacteur soumis à un éclairage approprié, dans des conditions contrôlées de température, de pH et d'alimentation en dioxyde de carbone CO₂.

3) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'éclairage du photobioréacteur est réalisé par l'énergie solaire ou par un éclairage approprié.

4) Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce que l'alimentation en CO₂ est réalisée par bullage d'air enrichi en CO₂ comprimé.

5) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'après une durée de 10 à 12 jours on ajoute au milieu de culture 100 mg/l de bicarbonate de potassium, puis on ferme le réacteur pendant une durée de 1 à 3 jours pour réaliser la sursaturation en oxygène.

6) Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que la filtration du milieu de culture après la centrifugation destinée à en séparer les algues s'effectue sur un filtre constitué d'une membrane cellulosique à dimensions de pores comprises entre 1 et 1,5 µm.

7) Extrait à propriétés anti-oxydantes et pro-cicatrisantes obtenu selon le procédé qui fait l'objet des revendications 1 à 6, caractérisé en ce qu'il renferme au moins 30 U/ml de superoxydismutases like (SOD like) et au moins 1 mg/ml de polysaccharides sulfatés.

8) Extrait à propriétés anti-radicalaires obtenu à partir de l'extrait selon la revendication 7, par

précipitation à l'aide d'un solvant ou par séparation à l'aide d'une membrane cellulosique, caractérisé en ce qu'il renferme au moins 30 U/ml de SOD like.

5 9) Extrait à propriétés de régénération tissulaire obtenu à partir de l'extrait selon la revendication 7, par précipitation à l'aide d'un solvant ou par séparation à l'aide d'une membrane cellulosique, caractérisé en ce qu'il renferme au moins 1 mg/ml de polysaccharides sulfatés.

10 10) Extrait selon la revendication 8 ou la revendication 9, caractérisé en ce que la séparation est réalisée à l'aide d'une membrane cellulosique de dimensions de pores comprises entre 1 000 et 50 000 daltons.

15 11) Extrait selon la revendication 8, ou la revendication 9, caractérisé en ce que la précipitation est réalisée à l'aide d'éthanol.

12) Utilisation de l'extrait selon la revendication 7, comme anti-oxydant dans la fabrication des polymères.

20 13) Utilisation de l'extrait selon la revendication 7 ou la revendication 8, dans la préparation de compositions diététiques anti-stress oxydatif.

14) Utilisation de l'extrait selon la revendication 7, ou la revendication 8, pour la conservation de produits alimentaires.

25 15) Utilisation de l'extrait selon la revendication 7, dans la préparation de produits cosmétiques destinés à ralentir le vieillissement cutané.

16) Utilisation de l'extrait selon la revendication 7, dans la préparation de compositions anti-inflammatoires, notamment en rhumatologie.

30 17) Utilisation de l'extrait selon la revendication 9, dans la préparation de compositions destinées à la lutte biologique contre les parasites végétaux.